

## 2. 新技術・新産業の創出に関する報告

サブテーマ名：A 高速分子進化のための基盤技術の開発  
小テーマ名：A1 進化リアクタープロセスの改良

フェーズ I <1-a>, <1-b>の一部

### [概要]

核酸・タンパク質・ペプチドを高速分子進化させる基盤技術として、試験管内分子進化技術 (*in vitro evolution*) を実用化・洗練化した。これに伴って、関連の技術・装置を開発した。とりわけ、フェーズ I においては、核酸やペプチドを対象とした有用分子のスクリーニング(淘汰)のための実験系全体の骨組みを築くことに営み、フェーズ II では、カテプシン E 阻害分子や活性化分子の高機能化のための実験系あるいは、高速分子進化させるための実験系へと洗練していった。このため、フェーズ II は次のような細目テーマに分けて実施した。

(1) カテプシン E 阻害/促進アプタマーの機能高度化、(2) アミロイドベータを標的としたアプタマーの創出、(3) 多重並列微量容器(MMV)に基づく迅速淘汰解析系の実用化および多機能化、(4) FRET 応用淘汰解析系の実用化、(5) アプタマー自動創出用進化リアクターの作製、(6) 自然淘汰型進化フローリアクターの作製、などである。

### [フェーズ I の研究成果]:

主として核酸の試験管内分子進化技術の洗練を行い、関連する技術 (SF リンク法など) の開発を行ない、具体的にカテプシン E 阻害 DNA アプタマーを獲得しうるものとした。同時にタンパク質・ペプチドの分子進化を実現するための、基本的実験系を確立した。

生体内で種々なプロテアーゼ (トリプシン、カテプシン、カスパーゼ、MMP・・・) が作用し、生命活動を支えていることが知られている。これらが適切な時期に適切な場所で適量に作用することが重要であり、これらが狂ったために深刻な病気 (ガンやアルツハイマーや免疫疾患など) が引き起こされることがある。その予防・治療にはそれらの酵素の阻害剤 (あるいは逆に促進剤) が必要となる。本研究では、そのようなプロテアーゼ阻害剤を淘汰し、更に進化させるための一般的方法論の確立を最終目的としている。そのために実際的には、既に確立している進化分子工学の要素技術 (*in vitro virus* 法、ブロックシャフリング法など) を取り込み、改良を施し、さらに新規の要素技術を開発・付加し、系全体として高速分子進化を実現するものに仕上げることを目指した。フェーズ I ではプロテアーゼ・カテプシン E を調製し、それに対する DNA インヒビターを淘汰し、それらを通じて実験系全体を立ち上げていく努力を行った。同時に、ペプチド型 I V V ライブラリーの作成と淘汰を実践し、カテプシン E 阻害 DNA アプタマーを超えるタイプの異なる分子の創製を目指した。一方では、迅速淘汰系の実現のために多重並列微量容器 (MMV) の作成や試料反応・検出系の検討を行った。

実験方法としては(i) 変異体ライブラリーの作成(図 1)と改良、(ii) 情報分子と機能分子の対応付け”*in vitro virus*”法の改良、(iii) 情報分子と機能分子の一体型 DNA アプタマー法の検討(図 2)、(iv) *in vitro* 淘汰系 (ビーズ法、ゲルシフト法、SF リンク法など) (図 2-4) の確立、(v) ハイスループット多検体並列処理系 (図 6) の開発の各々について、それぞれ図に示すような方法を用いた (試料のカテプシン E については、小テーマ C1 のフェーズ I (<3-1-c>) の報告を参照)。

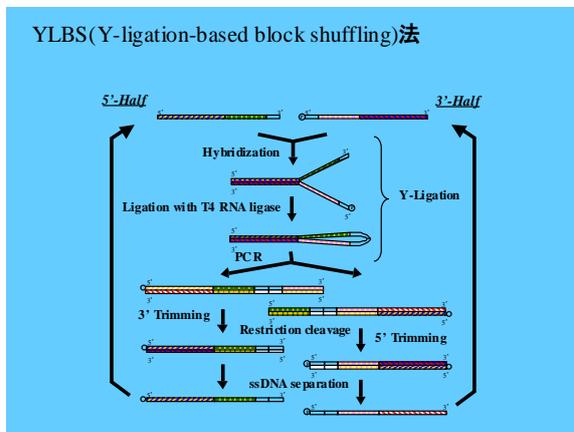


図 1 ブロックシャフリング法による変異体の作成

各研究成果を以下に詳しく述べる。

(1) プロテアーゼインヒビターに対する淘汰系の整備

① ライブラリー： 先ず、用いる DNA ライブラリーとしては、図 1 に示す Y 連結ブロックシャフリング(YLBS)法で得た Y<sup>4</sup>ライブラリー (48mer のオリゴデオキリボヌクレオチドが主成分) を合成・使用した。このライブラリーは理論的には  $3.3 \times 10^{13}$  の分子多様性を有しておりペプチド淘汰用にも使用可能となっているものである。ライブラリーの品質評価から、ある程度合成前段の Y<sup>3</sup> などを含んでいるとわかったものを分子多様性の観点からそのまま用いた。

② DNA-プロテアーゼの第一段淘汰(親和性淘汰)： 本プロジェクトのためにプロテアーゼとして、カテプシン E を新たに調製し、マグネットビーズ法で淘汰した。淘汰強度(ストリジエン)を種々変えながら、図 2 に示す淘汰サイクルを約 10 ラウンド回した。これとは別にプロテアーゼとしてトリプシンを用い、ゲルシフト法で淘汰をおこなった。この際に、一本鎖(ss)領域を末端に提示するコンストラクト(通常的方式では PCR をするためのプライマー配列を両側に持つことになる)を構築するための特別な方式を考案した。これにより淘汰されてきたカテプシン E 阻害 DNA (DNA-CEI) 候補に関して、機能による第二段淘汰に進めた。

③ DNA-CEI の第二段淘汰(機能淘汰)：

図 3 に示すような“SF リンク”と称するコンストラクトを考案し、これにより機能淘汰を行った(ここでの作業分子は第一段淘汰によって選ばれてきた配列を含みながら、わずかに付加配列をもつ)。原理は図 4 に示すように「結合が阻害に結びつかないもの多くが酵素により切断される可能性が高い」ことにより、最終的に阻害的な結合様式のもの割合を高めるものである。これにより、SF リンクの 6 回のサイクルにおいて順調な阻害活性向上が見られた(ペプスタチン相対阻害活性 8% から 30% 以上への向上)。

④ クローン化 CEI の調製と特性評価：

SF リンクのラウンド 6 などの DNA をクローン化し、これらの中間淘汰産物の配列決定や K<sub>d</sub> 測定を行った。K<sub>d</sub> は SPR 法で求めたが、多試料処理のために非 RI 方式のゲルシフト K<sub>d</sub> 測定法の確立が望まれ、‘プロテアーゼ-DNA アプタマー系’の条件を検討し概ね確立した。本研究で得られた DNA タイプの CEI の最も強い K<sub>d</sub> は SF6-#3 クローンの 15 nM であった。この分子の構造は、図 5 に示す i-モチーフタイプ的一本鎖 DNA である可能性が示された。

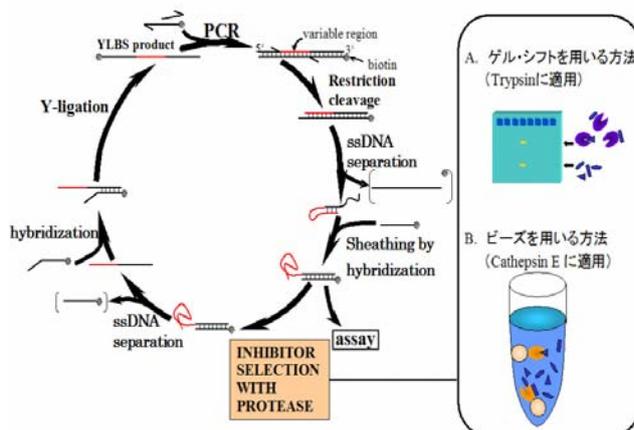


図 2 プロテアーゼ阻害 DNA の第一段淘汰サイクル  
この方式では可変領域が一本鎖核酸構造として提示され、淘汰に供される

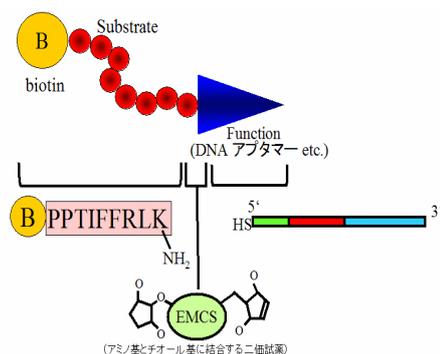


図 3 SF リンク 基質 (Substrate) と機能 (Function) 部分を 2 価試薬が結び付けている

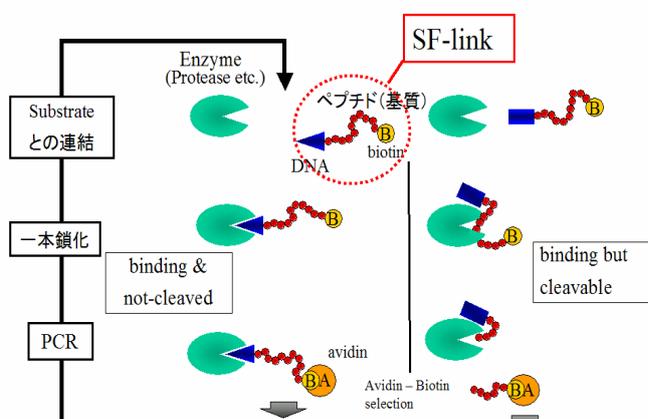
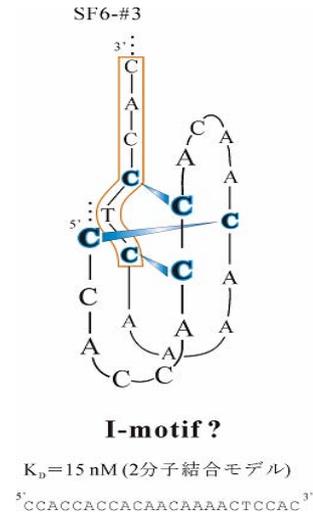


図 4 SF リンクを用いた機能による淘汰のサイクル

図5 DNA型CEIの  
予想される構造



### (2) 多重並列微量容器 (MMV) の作成

図6 に示すような装置 (DMD プロジェクター) を構成し、アクリルアミドゲルを媒質として、光化学反応的に、多重並列微量反応容器 (MMV) の作成を試み成功した。この結果、図7に示すような 1024 穴/inch<sup>2</sup>の作成やさらに 10000 穴/inch<sup>2</sup>にも成功し、これらを実際の反応容器として使用している。

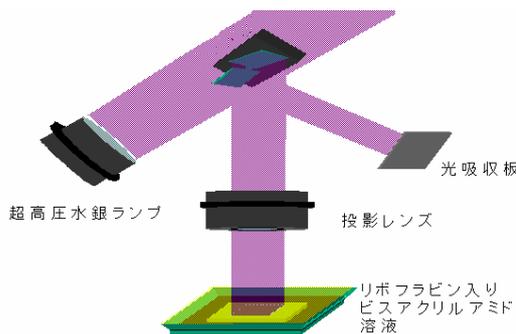


図6 DMD プロジェクターによる  
MMV 作成の基

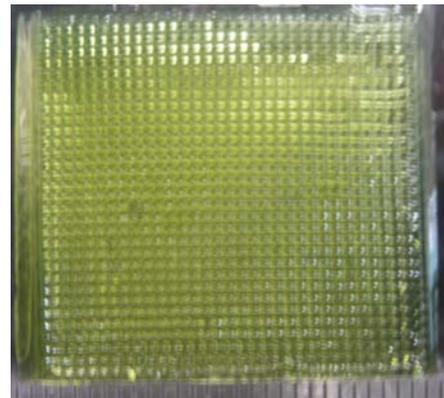


図7 ポリアクリルアミドゲル製の  
1024 穴 MMV それぞれの穴が精確に形  
成されている

### (3) カテプシン E 阻害ペプチドアプタマーの創製

まず、ペプチド型 IVV ライブラリーのための初期ライブラリーの合成として、アミノ酸対応ブロック (コドン単位) のオリゴヌクレオチドを YLBS 法 (図1) で連結しライブラリーを作製した。mRNA 転写、タンパク質翻訳の一連の反応過程のための DNA コンストラクトを構成し、転写反応の直後にピュロマイシンリンカーを連結し、翻訳反応に進めて IVV (in vitro virus) 化した。こうしてできた IVV ライブラリーを用いて、カテプシン E 結合性の IVV を淘汰した。次のステップとして、SF リンク法により阻害活性を有する IVV を濃縮淘汰した。最後に IVV として、あるいはそのペプチド部分のみを純粋に調製し、構造と活性を調べた。

その結果、オクタペプチドを提示した IVV ライブラリーの合成 (10<sup>11</sup>分子多様性) に成功し、そこからペプスタチンの 55% の阻害活性をもったペプチド型 IVV を淘汰した。ペプチド部分 (23 アミノ酸残基) だけでも 30% 弱の阻害活性があることがわかった。



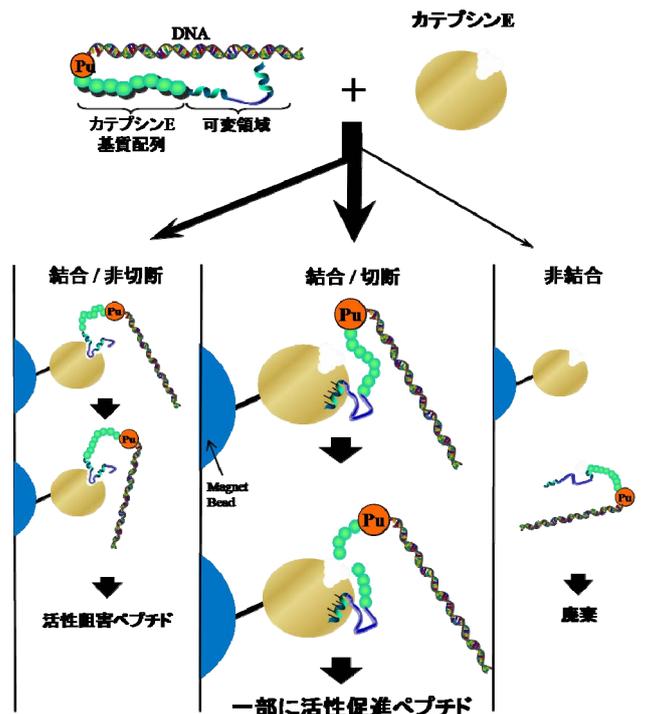


図10 SFリンク法で活性促進ペプチドを淘汰する

そのことから、CE 活性促進ペプチド獲得のために、ビーズに固定化した CE と IVV-SF-link ライブラリーを結合させた後、より早く切断されたものを回収することで（図10中央）活性促進ペプチドの淘汰を行った（SF-link 逆モード）。その結果、高いものではCE活性を140%程度向上させるペプチドが得られており、SF-link 法を含む eRAPANSY 法全体が活性促進ペプチド淘汰においても有効であることが示された。

## (2) 多重並列微量容器 (MMV) を用いた淘汰系の開発

同時に多数のクローンを評価する実験系は一般性のある有用な系であり、フェーズ I で試作された多重並列微量容器 (MMV) を“体積利用型マイクロアレイ”として開発を進めた。MMV としては 1,024 ウェルの系で、ペプチド作製から CE 活性測定まで一連の酵素反応、すなわち、PCR、転写・翻訳反応、CE 阻害活性測定などを行うことによって、順調に行けば 1,024 サンプル/2 日のペースでクローンの評価が可能な系を築いた。一連の反応後、消光性基質によって CE 活性測定を行った結果を図 11 に示す（図中の黒くなっているウェル部分は活性が阻害され、蛍光反応がないことを示す）。これらのウェルから DNA を回収しペプチド阻害活性を調べ、約 55% の高い阻害活性を持ったクローンを獲得した。

### 10<sup>3</sup>MMVによるカテプシンE阻害ペプチドの淘汰

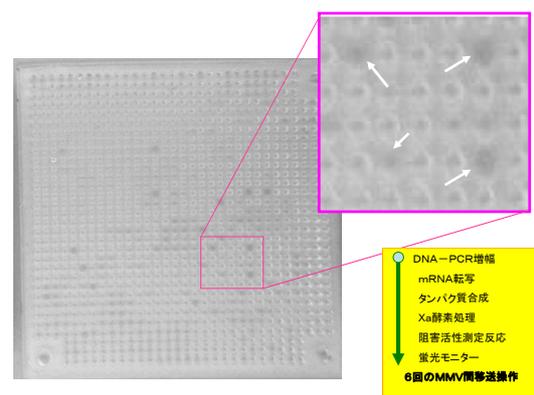


図11 MMV

一方、フェーズ II で新たにマイクロアレイ作成・測定システムを構築した（図12）。光学系は全体を新しく設計し、対物レンズ群をテレセントリックにしたことにより、位置精度の高い投影・集光が可能になった。DMD ミラー面の照明にはプリズムを用いると共に専用のインテグレータを設計したことにより、歪みの少ない光学系を構成した。また、観測方法の

根本的な見直しを行い、励起光を連続光からパルス光に変更すると共に、蛍光観測は積分電流観測からフォトンカウンティングへと変更した。この結果、励起光と蛍光を分離計測する技術としてフェーズ I で用いた光学フィルタだけでなく、時間分解計測手法を併用することが可能になった。

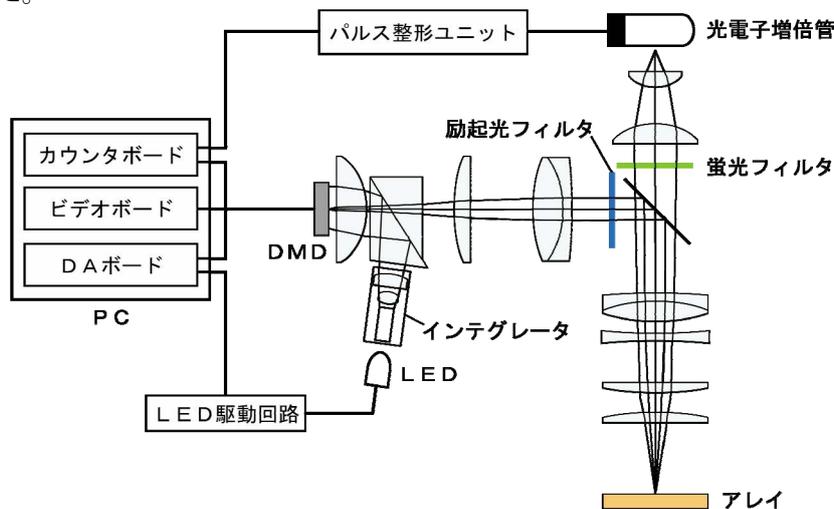


図 12 DMD を用いたマイクロアレイ作成測定装置

励起光源として用いる LED を短時間点灯する駆動回路には図 13 に示す回路を用いた。この回路ではパルスの立ち上がり入力により Tr1 が ON となり LED が点灯する。時定数  $C1 \cdot R2$  に従い Tr2 は Tr1 よりも遅れて ON となり、Tr1 に供給されているベース電流を GND に流すため、Tr1 を OFF にして LED の電流を遮断する。このときの LED 励起電流のパルス幅は回路時定数  $C1 \cdot R2$  だけでなく、Tr1, Tr2 のスイッチング動作速度により決定される。LED の点灯タイミングと光電子増倍管からのパルスを計数するタイミングは図 12 に示すパーソナルコンピュータ (PC) 内の DA コンバータから出力されるトリガー信号により制御し、最高 100kHz の繰り返し周波数で点灯する光パルスに対して任意の回数の蛍光応答波形を積分することが可能である。

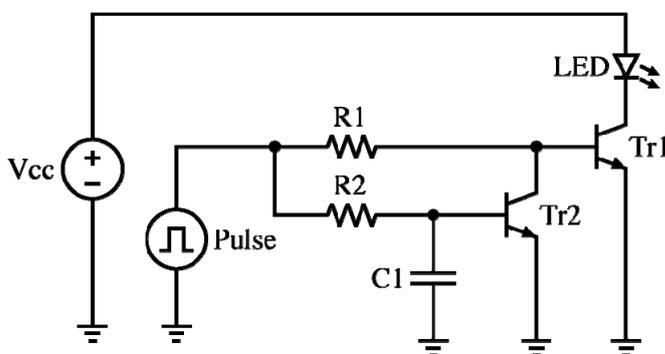


図 13 LED パルス点灯回路

この他、検出装置の改良として LED 電流の増加やトランジスタの並列化が有効であるという見通しがついた。

アプタマー配列 (12種類)		スパーサー配列 (3種類)	アプタマー配列 (12種類)
Streptavidin binding peptide	Xa	可変領域	Stop codon / PolyG
#	名前	アミノ酸配列	活性
1	F9-62	DGCCIIIII	阻害活性 ▲37.3%
2	F9-65	GCGGLLPF	阻害活性 ▲31.5%
3	F5-17	GGSCSSCL	阻害活性 ▲24.2%
4	2A-301	SCGGIIIIISCIA	阻害活性 ▲54.6%
5	2A-213	ITDSIIIIISWIG	阻害活性 ▲42.8%
6	2A-317	IIIIIIQLIFSAW	阻害活性 ▲41.1%
7	2A-21	NDDKIIIIICCI	阻害活性 ▲37.8%
8	2A-215	NYKDSCIG	阻害活性 ▲33.6%
9	2A-28	SGLLFRPEGR	阻害活性 ▲22.8%
10	2A-6	GGRPIIIIGG	阻害活性 ▲22.3%
11	a2A-24	IPGRIGCI	残存活性 141.3%
12	a2A-26	GCPCIDFI	残存活性 135.0%
スパーサー配列			
13	Poly Gly	GGGGGGGGGG	
14	Spacer 1	GGGSGGGSGG	
15	Spacer 2	GGGPGGGPGG	

図 14 三次ライブラリーに使用した配列

### (3) 三次ライブラリー（ペプチドペア）法による機能高度化

これまでに開発した eRAPANSY や MMV 技術によりえられた阻害活性ペプチドを上回る高活性な阻害ペプチドを得るために、獲得されたペプチド配列をリンカーを介して連結した三次ライブラリーを作製し、淘汰を行った。これにより、加算的に結合能を高め、さらに活性が高まったペプチド分子を得ることに成功した。

今回作製した三次ライブラリー（ペプチドペア）は、一次、二次ライブラリー淘汰で得られた高活性ペプチド配列を 10 アミノ酸長のスペーサー配列を介して連結した構造になっている（使用した配列を図 14 に示す）。その後、作製されたライブラリーを IVV-SF-link コンストラクトに組み込み、CE 阻害ペプチドの淘汰を行った。

得られたペプチドペア由来クローンの阻害活性を調べた結果、図 15 に示すように、一次、二次ライブラリー由来のものと比較して、より強い阻害活性を持っていた。その値も約 72% に達していた。この事はペプチドペア方式が活性向上にとって有効である事を示している。

さらにこの方式では、加算的に結合能を高め、それに伴って活性が高まった分子を得ることが期待されるのみならず、ペプチドペアの活性情報からターゲット分子に対する各ペプチドの結合領域（“エピトープ”）が推測できるという利点を有している。すなわち、タンパク質表面構造をエピトープマッピングすることが可能である。それは、タンパク質間相互作用の一般的解析手段となる可能性がある。

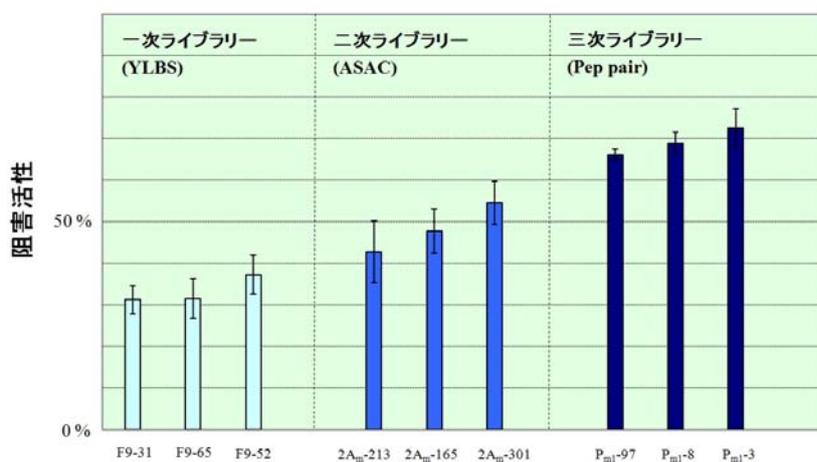


図 15 ライブラリーの進展と阻害活性の段階的向上。図にはトップ3が示されている。

### (4) DNA アプタマー創出進化リアクターの作製

DNA アプタマーをロボットで自動的に取得するために、自動分注機、液晶タッチパネル、作業ステージ、殺菌灯等から構成されるアプタマー創出進化リアクター（外形寸法 W950×D750×H1600 mm）を組み上げた(図 16)。作業ステージ上にはチップラックホルダ、チューブラックホルダ、チューブキャップホルダ、試薬槽、PCR、サンプル保管槽、磁気ビーズ固定化装置等を配置した(図 17)。本装置は、初期ランダム DNA ライブラリーの磁気ビーズを利用した洗浄淘汰と、ライブラリー再構成のための PCR、一本鎖 DNA 調製を基本サイクルとし、これらを複数サイクル単独で実行できるように構成した。そのためアプタマー取得プロセスは長大なプログラムにより管理されており、稼働試験を行いながらソフトウェアプログラムの変更、最適化、また必要に応じてユニットの改良を施した。

装置評価は実運転と同様なサンプルを用い、操作終了後のサンプルをポリアクリルアミド電気泳動観察により行った。



図 16 アプタマー創出進化リアクター (ACER1000)

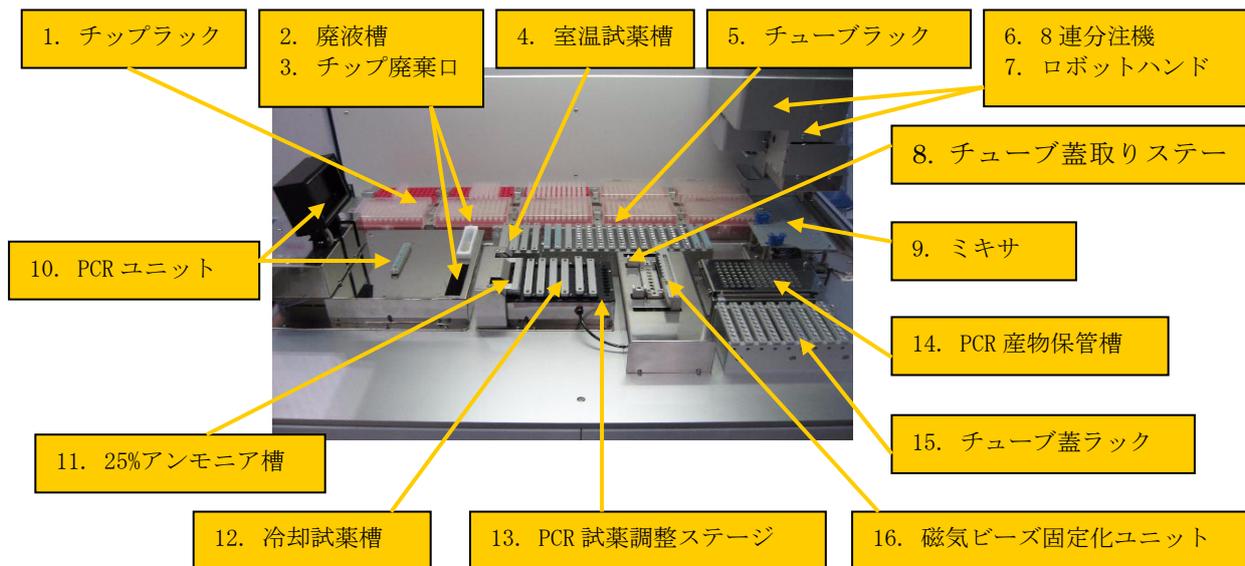


図 17 アプタマー創出進化リアクター装置内部

検討実験に用いた初期 DNA ライブラリーは、50 塩基のランダム配列領域とプライマー配列領域を含む 94 塩基の一本鎖 DNA にビオチン標識したものを、PCR 反応後増幅産物の一部をアビジン化磁気ビーズと結合させアルカリ変性法を利用し、一本鎖化した。残りの PCR 反応後増幅産物は評価等に用いるために冷却保存槽へ保存するようにプログラムした。サイクル毎に得られた PCR 産物と、再構築されたライブラリーの電気泳動による確認を行い、淘汰されたと考えられるサンプルを次サイクルに用いた。淘汰サイクルにおける評価を行った結果、8 連サンプルにおいて攪拌等に起因すると考えられる斑が生じた。そのため、均一かつ良好なサンプル攪拌結果を得るためピペティングによる攪拌のみならず、サンプル保持ステージ、回転振動子、防振ゴムから構成された攪拌ユニットを増設し効果をあげた。

アミロイドベータ ( $A\beta$ ) 42 に対する DNA アプタマー取得実験を通じて、アプタマー創出進化リアクターのシステムとしての運転性能テストを行った。その結果、10 サイクル運転から、 $A\beta$  に緩やかに結合する DNA アプタマーとして、C11、F7 が得られた (表 1)。

表 1 DNA アプタマー創出進化リアクターを用いて取得されたアミロイドベータ 42 結合 DNA アプタマー候補配列 (C11, F7)

C11:	GATGC	ACGGG	AATGC	AGCTG	GAGTC	GGCTG	AAATA	GGAAC	GGTAT	GTGGG
	ATTAA	GTGAA	GCGCT	AGTGG	ACCGC	CTACA	GTGTC	TGCTG	GTT	
F7 :	GATGC	ACGGG	AATGC	AGCTG	GACGG	GAAGC	GAAGG	TGAAC	GGGGA	AGAGT
	CAGGA	GTGGG	TGGTA	AGATC	GGCCG	CCTAC	AGTGT	CTCTG	CTGGT	T

#### (5) 酵素活性感受性バイオプローブの開発

生体内で生命活動を支えている種々なプロテアーゼ (トリプシン、カテプシン、カスパーゼ、MMP・・・) の作用が異常になると深刻な病気 (ガンやアルツハイマーや免疫疾患など) が起こる。この予防・治療にはそれらの酵素の活性阻害・促進剤が有効となる。ここではターゲットプロテアーゼ及び他のプロテアーゼをも淘汰する上で有用な FRET 利用プローブの開発を行った。バイオプローブの検知原理として蛍光 2 分子間 (蛍光蛋白質-蛍光色素、蛍光タンパク質-量子ドット、蛍光色素-量子ドット) の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いている。プロテアーゼ感受性バイオプローブでは、酵素認識部位を組み込んだ蛍光タンパク質変異体と蛍光色素 (あるいは量子ドット) という組み合わせを用いる。フェーズ I にて作製してきた緑色蛍光タンパク質の天然のシステインをセリンに置換、別部位にシステ

インを導入、その N 末端側の蛍光タンパク質の配列を酵素認識部位候補配列に置換（一部挿入）、システインを介し蛍光色素（あるいは量子ドット）で化学修飾、酵素の処理の前後における FRET 効率の変化率に酵素活性を変換するバイオプローブの一般化、併用性の確立とターゲットケースへの適用のため、酵素認識部位候補配列の多様化と蛍光タンパク質の色変異体の利用を行った。

### 1) 酵素認識部位候補配列の多様化

カスパーゼ 2、3、9、トリプシン、エラスターゼ、セパラゼ、カテプシン B、D、E の認識アミノ酸配列を挿入した蛍光タンパク質変異体を作製した（図 18）。いずれも酵素未処理において FRET 効率は基幹プローブのまま保持され高かった。ただし、酵素活性の感度となる FRET 効率の変化率は挿入配列に依存した。

### 2) 蛍光タンパク質色変異体の適用

青色、黄色、赤色蛍光タンパク質に対し、基幹プローブ能を付与する変異を導入したところ、すべての色変異体において高効率の FRET が観察された（1 例として、図 19）。

### 3) カテプシン E 特異的プローブ

これまで、緑色蛍光蛋白質（GFP）を基幹とする高感度カテプシン E 感受性バイオプローブ 1 種（中性用）、GFP を基幹とする高感度カテプシン D/E 共通感受性バイオプローブ 1 種（中性用）、GFP を基幹とする低感度カテプシン D/E 感受性バイオプローブ 1 種（酸性中性用）、赤色蛍光蛋白質(RFP)を基幹とする低感度カテプシン D 感受性バイオプローブ 1 種（酸性用）、RFP を基幹とする高感度カテプシン D 感受性バイオプローブクローン 1 種（酸性用）を得ている。これらのうち D/E 共通のもの以外は既存の酵素基質として知られている配列とは異なり、このプロジェクトの過程で新規に活性測定用基質として確定されたものである。また、カテプシン E 感受性バイオプローブを用いて阻害剤との競合実験を行ったところ、阻害剤スクリーニング基質として使用可能であることが確認できたが、また、ペプチド基質を用いた場合には得られないような阻害機構に対する示唆的データが得られた。

これらの成果の上に、バイオプローブの *in vitro*（マイクロプレート・チップ）アッセイへの適用（図 20）、および *in vivo*（細胞ベース）アッセイへの適用を展開している。

#### pH sensor (BFP based)

MASMTGGQQMGR MVSKG**C**ELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTLKFIST**Y**  
GKLPVPWPTL

VTTLTHGV**Q**C FSRYPDHMKQ HDFFKSAMPE GYVQERTIFF KDDGNYKTRA EVKFE**G**DTLV  
NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNFN**S**HNV YIMADKQKNG IKVNFKIRHN IEDGSVQLAD HYQQNTPIGD  
GPVLLPDNHY LSTQSALSKD PNEKR**D**HMVL LEFVTAAGIT LGMDELYK **GG HHHHHH**

#### Cathepsin E sensor (GFP based)

MASMTGGQQMGR MSKGE**E**LFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTLKFIS**T**T GKLPVPWPTL  
VTTLTYGV**Q**C FSRYPDHMKR HDFFKSAMPE GYVQERTISF KDDGNYKTRA EVKFE**G**DTLV NRIELKGIDF  
KEDGNILGHK LEYNYNSHN**V** YITADKQKNG IKANFKTRHN IEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY  
LSTQSALLKD PNEKR**D**HMVL LEFVTAAG**SGSSG**IT **SSIVHLRGT**C ELYK **GG HHHHHH**

#### Cathepsin D sensor (RFP based)

MASSEDVIKE FMRFKVRMEG SVNGHEFEIE GEGEGRPYEG TQTAKLK**V**TK GGPLPFAWDI LSPQFQYGSK  
VYVKHPADIP DYK**K**LSFPEG FKWERVMNFE DGGVV**T**VTQD SSLQD**G**EFYI KV**K**FIGVNF SDGPVMQKKT  
MGWEPSTERL YPRD**G**VLKGE IHKALK**L**KDG GHYLV**E**FKSI YMAK**K**PVQLP GYYYVDSKLD ITSHNEDYTI  
VEQYERTEGR **HHLFLSGT IAFFSRQEDGTCGG HHHHHH**

#### Caspase-3 sensor (RFP based)

MASSEDVIKE FMRFKVRMEG SVNGHEFEIE GEGEGRPYEG TQTAKLK**V**TK GGPLPFAWDI LSPQFQYGSK  
VYVKHPADIP DYK**K**LSFPEG FKWERVMNFE DGGVV**T**VTQD SSLQD**G**EFYI KV**K**FIGVNF SDGPVMQKKT  
MGWEPSTERL YPRD**G**VLKGE IHKALK**L**KDG GHYLV**E**FKSI YMAK**K**PVQLP GYYYVDSKLD ITSHNEDYTI  
VEQYERTEGR **HHLFLSGT DEVDGTCGG HHHHHH**

図 18 代表的なバイオプローブのアミノ酸配列

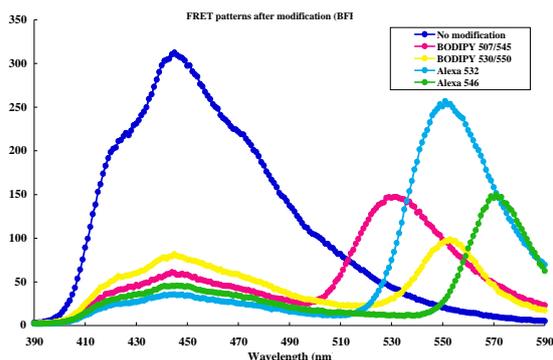


図 19 BFP 由来基幹バイオプローブ特性



図 20 バイオプローブ使用複数同時可視化装置

### (6) 核酸の自然淘汰型進化リアクターの作製

核酸の等温増幅反応を連続的に行うと複製反応速度定数を適応度とする「自然淘汰」による DNA 分子の進化が起こる。ちなみに、上記の全ての進化プロセスは Directed evolution と称される「人為淘汰」に基づくものである。自然淘汰は自律進化を実現させるので、次世代の進化学として検討しておく価値がある。自然淘汰は継代植え継ぎでも実現できるが、連続プロセスの方が環境条件の制御に優れる。そこで、高温 RNA-Z 反応をテストケースとして連続反応を実現する図 21 のようなマイクロフローリアクターを構成した。酵素やプライマー等の試薬を保存するための冷却試薬槽 (4°C)、トレハロース等を保存するための恒温試薬槽 (50°C)、各試薬をマイクロリアクターセルへ注入するためのシリンジポンプユニット (2 ユニット)、試薬切替バルブ、マイクロリアクターセルを恒温するための温調ユニット (50~94°C)、マイクロリアクターセル内の溶液を攪拌するための磁気ビーズ攪拌ユニット、その他、運転プログラムおよび、各種パラメータ等の設定は装置本体上部 (前面) に設置された液晶タッチパネルにて行う。またプログラムの設定は外部コンピュータでも設定可能であり、USB ケーブルを用いて容易に転送が可能になっている。更に、未使用時には UV ランプにより滅菌や外来 DNA の分解を行うこともできる。マイクロリアクターセルは、小テーマ A4 との共同研究で作成した (小テーマ A4 の報告を参照)。



図 21 進化フローリアクター

### [今後の展開]:

開発した技術 (eRAPANSY や MMV 技術) や装置 (DNA アプタマー創出進化リアクター) をさらに発展させるプロジェクトを立ち上げていく。また、本研究で生まれた“エピトープ分割”などの新しい概念と技術を発展させる。既に、3 年計画の文部科学省「都市エリア」事業に採択されたプロジェクトが並走しているが、その中でがん治療などの創薬シーズとなる機能性分子を探索するのにここでの開発技術を用いていく。DNA アプタマー創出進化リアクターをさらに複雑なペプチドアプタマー創出進化リアクターへと発展させていくためのプロジェクト、新しいコンセプトの“体積活用型マイクロアレイ”である MMV を本格実用化するためのプロジェクト、および、バイオプローブによる創薬のためのハイスループット化プロジェクトなどを、それぞれ、地域コンソーシアム事業、独創的シーズ展開事業、産学共同シーズイノベーション化事業 (育成ステージ)、などに申請する予定である。以上を通じて、本プロジェクトの成果を十分に活用・展開する。